



Title	ポプラの開葉期および生長停止期の脂質代謝
Author(s)	吉田, 静夫
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 53-63
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17783
Type	bulletin (article)
File Information	29_p53-63.pdf



[Instructions for use](#)

ポプラの開葉期および生長停止期の脂質代謝*

吉田 静夫

(低温科学研究所)

(昭和46年10月受理)

I. 緒 言

樹木のような永年性植物の生活相の変化と脂質代謝の関連についてのべた報告はこれまでみられない。脂質は生体膜の構成成分であるから、その代謝は生体膜の代謝の一側面をなすものと考えられる。こうした意味で、季節的な脂質代謝の変化を追究することは、生体膜の動的な変化を理解するために必要であると思われる。

これまでのグリセロール- $1-^{14}\text{C}$ を用いた実験で¹⁻²⁾、ポプラの年間を通じてのグリセロール代謝の変化が次第に明らかになってきた。その中で、脂質へのとりこみについてふれたが、各脂質へのとりこみは十分に明らかではない。

この実験では、DEAEセルローズカラムクロマトグラフィーとラジオ薄層クロマトグラフィーにより、脂質代謝をグリセロール- $1-^{14}\text{C}$ および醋酸- $1-^{14}\text{C}$ のとりこみから詳細に検討したものである。

この実験の費用の一部は、昭和46年度科学研究補助金(特定研究)によりまかなわれた。

本文ではつぎの記号を用いた。PG, ホスファチジルグリセロール; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PC, ホスファチジルコリン; PS, ホスファチジルセリン; PI, ホスファチジリノシトール; MGD, モノガラクトシルジグリセライド; DGD, ジガラクトシルジグリセライド; SL, スルホリピド; S, ステロール; SE, ステロールエステル; TG, トリグリセライド; DG, ジグリセライド; NL, 中性脂質; PL, リン脂質。

II. 材料と方法

材料: 圃場に植えられているポプラ *Populus gelrica* と1月26日に戸外から室内に入れたポプラ *Populus gelrica* の鉢植苗を使用した。戸外では、4月8日頃は冬芽の活動が外観上認められないが、4月20日頃に冬芽の表面にある樹脂状の物質がとけ始め、冬芽が活動を始めた。4月26日に開芽し、芽の基部が約2mmほど緑色を呈していた。5月19日には新芽が3cmほど伸び新葉が次第に大きくなりつつあった。1月26日に戸外から室内に入れたポプラは、2月15日頃から開芽し、4月末頃に冬芽を形成し生長を停止した。6月初旬には形成層の活動も低下し、剥皮が困難になった。

グリセロール- $1-^{14}\text{C}$ と醋酸- $1-^{14}\text{C}$ (ナトリウム塩)はともに第一化学薬品株式会社から購

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1165号

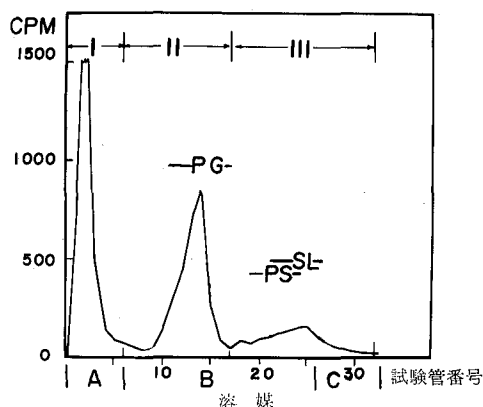
入した。両者の比放射能はそれぞれ 10 mCi/mm および 45 mCi/mm であった。最終放射能濃度は両者とも 0.2 μ Ci/ μ l となるように調整した。DEAE セルローズは Serva 社のものでそのイオン交換容量は 0.95 meq/g であった。薄層クロマトグラフィーには Merck 社のシリカゲル H を使用した。

脂質の抽出法： ポプラの枝 (直径 0.6 cm, 長さ 5.0 cm) 一本あたり 10 μ l (2 μ Ci 相当) の放射性化合物を切口の材の部分に与え、20°C で一定時間反応させた¹⁾。反応後、枝を皮と材に分け、その各々を 5 ml の *n*-プロパノール中で 4°C で磨砕しクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) で 3 回抽出した。抽出液は濃縮後 Folch の方法で水洗し非脂質成分を除いた。この場合の水層と残渣の 0.1 N HClO₄ 抽出液とを合わせて水溶性画分とし、まえの報告でのべた方法¹⁻²⁾ でこれをいろいろな画分に分けた。

DEAE セルローズカラムクロマトグラフィー： Allen らの方法³⁾ に準じて行なった。1 N HCl ついで 1 N NaOH で処理後水洗し無水メタノールで脱水乾燥した。その 1 g を氷醋酸に懸濁して加圧しながら 1×10 cm のカラムに充てんした。カラムは氷醋酸、メタノールついでクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) の順に流した。脂質は 30 ml のクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) (A) で溶出したあと、同溶媒 50 ml と同溶媒中に 0.1 M の濃度に醋酸アンモニウムを溶かしたもの 50 ml で直線的に濃度勾配をかけて溶出した (B)。ついで後者の溶媒 20 ml で追加溶出した (C)。

第 1 図に、グリセロール-1-¹⁴C を与えて反応させた皮 (4 月 20 日, 4 時間反応) の脂質のカラムクロマトグラムを示す。なお、ホウレン草の PG, SL および市販の PS を標準物質としたときのそれぞれの溶出位置を図中に示した。放射能ピークは三つの部分からなり、それぞれ画分 I, II および III とした。画分 II のピークは位置的に PG と一致する。

これらの各画分をシリカゲル H のプレ-

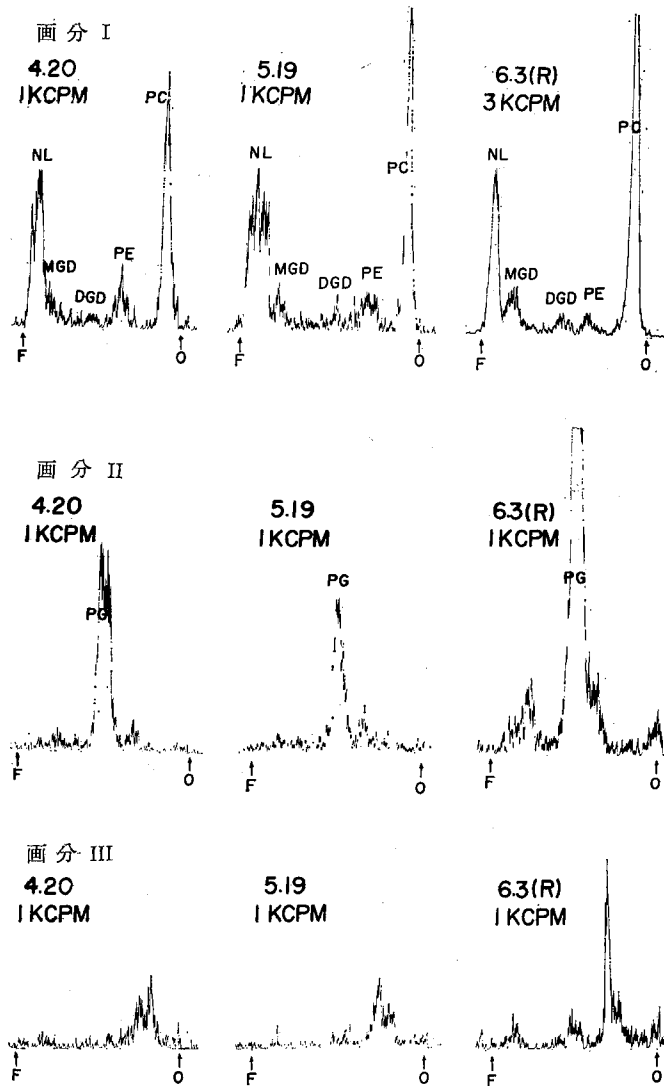


第 1 図 DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーによるポプラの脂質の分画

グリセロール-1-¹⁴C を与えて 4 時間 20°C で反応させたポプラの皮の脂質 (4 月 20 日戸外の枝)。PG, PS および SL はそれぞれ標準物質の溶出位置を示す。A, B および C は本文参照

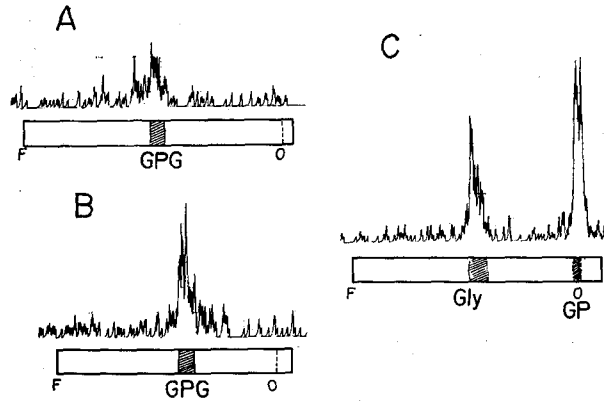
ート上でクロロホルム・メタノール・醋酸 (65:25:4, v/v) で展開し、ラジオ薄層クロマトグラフ装置 (日本無線株式会社) で放射能分布を測定した。その結果を第 2 図に示す。画分 I のラジオ薄層クロマトグラムの各放射能ピークは、ホウレン草の NL, MGD および DGD, 卵黄の PE および PC を標準として同時に行なった薄層クロマトグラフィーによりそれぞれ推定した。画分 II については、Ferrari らの方法⁴⁾ に従って脂質をメタノール性苛性カリ中でメタノリシスを行なった。その水溶性画分の一部はさらに 1 N HCl で 100°C 30 分間加水分解した。この水溶性画分の酸加水分解の前後について、Abisel SF セルローズプレートによるラジオ薄層クロマトグラムを第 3 図に示した。なお、標準物質としてホウレン草の PG を同様にメタノリシ

スして得られるグリセロホスホリルグリセロール (GPG) と市販のグリセロールおよび α -グリセロリン酸を同時展開した。画分 II とハウレン草の PG の水解物とはその薄層クロマトグラム上の位置において一致する。また、画分 II の酸水解物はグリセロールおよび α -グリセロリン酸と同じ位置に主な放射能が現われる。以上のことから、画分 II の主成分は PG と考えられる。画分 III は薄層クロマトグラム上 PE と PC の中間に現われ、PS や SL の位置とは一致しない。これは PI である可能性が強いが今のところ未同定である。



第2図 DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーにおける各画分のラジオ薄層クロマトグラム

材料: グリセロール-1- 14 C を与え 20°C 24 時間反応させた皮の脂質
 図中 O と F はそれぞれ展開の開始点と終了点を表わす



第3図 DEAEセルローズカラムクロマトグラフィーにおける画分IIのアルカリおよび酸水解物のラジオ薄層クロマトグラム

A, Bはアルカリ水解物のラジオ薄層クロマトグラムで、それぞれメタノール・ギ酸(98%)・水(80:13:7, v/v)およびフェノール・水(4:1, v/v)で展開。Cはそれを1N HClで加水分解したものをn-ブタノール・醋酸・水(120:30:50, v/v)で展開したもの。いずれもAbisel SFセルローズの薄層を使用。図中の記号はつぎの通りGPG, グリセリルホスホリルグリセロール(ホウレン草のPGのアルカリ水解物); Gly, グリセロール; GP; α -グリセリン酸

III. 結 果

1. グリセロール- $1-^{14}C$ の枝の脂質へのとりこみ

第1表に示すように、真冬は脂質へのとりこみが極めて少ない。4月8日頃は外観上芽の活動が認められないが、枝全体として含水量の増加が認められる。この頃から脂質へのとりこみが始まり、開葉の直前になって急激にとりこみが増加する。4月20日と5月19日の枝に

第1表 開葉期と生長停止期におけるポプラの枝のグリセロール- $1-^{14}C$ の脂質へのとりこみ

実験期日	反応時間 (時間)	脂質へのとりこみ (cpm $\times 10^{-3}$)		備	考
		皮	材		
1月19日	3.5	3.4	9.0	圃場のポプラ	
4月8日	3.5	40.0	12.3	冬芽変化なし	
4月20日	1	94.8	18.7	圃場のポプラ ヤニとけ始めて 開葉直前	
	4	275.0	72.1		
	24	345.6	124.0		
5月19日	1	119.0	57.0	圃場のポプラ 生長期、新芽 3cmほど伸長	
	4	337.5	116.3		
	24	367.6	154.0		
5月19日 (冬芽形成・新梢)	4	523.0	328.0	1月26日戸外から室内に 入れ、4月末に生長停止	
	24	809.4	439.0		
6月3日 (冬芽形成・新梢)	4	325.1	302.2	上と同じ	
	24	809.0	466.0		
6月3日 (冬芽形成・2年生枝)	4	316.4	377.7	上と同じ	
	24	839.2	419.3		

ついて、とりこみの時間経過をしらべたが、いずれの場合もおよそ4時間の反応で平衡状態に近づくことが明らかである。一方、真冬に室内に入れて開葉させ、4月末に冬芽を形成したポプラについてしらべたところ、材料の違いを考慮してもそのとりこみは非常に高い。これは、当年生の新しい枝でも、2年生の枝でも殆んど差が認められない。このように高いとりこみはこれまでの実験¹⁻²⁾で経験しなかったことで、材料の違いだけでなく生長停止直後の特徴をなすものと考えられる。

2. 醋酸-1-¹⁴C の脂質へのとりこみ

第2表に示すように、醋酸-1-¹⁴C の脂質へのとりこみは、これまでしらべてきたグリセロール-1-¹⁴C の場合とは対照的である。自然条件下で越冬中の枝でも比較的大きなとりこみがみられる。開葉前の2月と3月に皮あるいは材において、脂質へのとりこみが一時的に増加するような傾向がみられる。このことは、枝の違いによるのかどうか現在のところ明らかではない。開葉が進行するにつれて、皮、材ともにとりこみが低下するが、材において特にその傾向が著しいようである。このようなとりこみの変化は、真冬(1月26日)に室内に入れたポプラの開葉過程でも同様に認められる。また、室内で冬芽を形成したもの(6月2日)では、材において極めて高いとりこみが認められる。

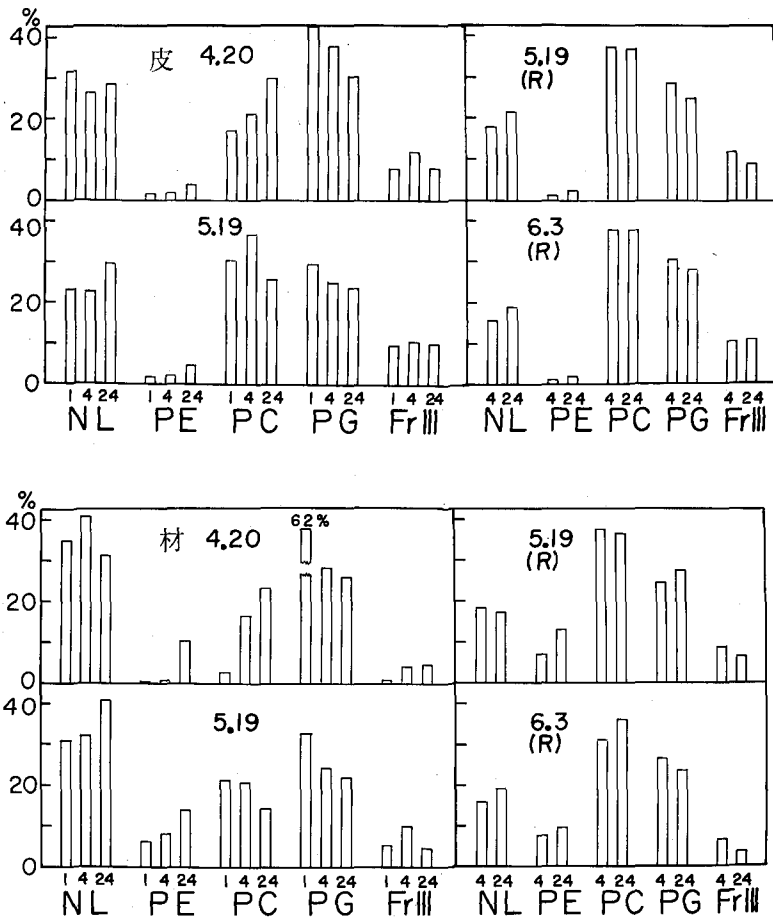
醋酸-1-¹⁴C のアミノ酸画分へのとりこみは、開葉前には低く開葉直前から急激に高まる傾向が認められる。

第2表 ポプラの枝の醋酸-1-¹⁴C のとりこみ (cpm×10⁻³)

	実験期日	反応時間 (時間)	脂 質		アミノ酸		備 考
			皮	材	皮	材	
自然 条 件	1月8日	{ 3 23	167.9	155.4	54.9	55.2	
			171.4	168.8	49.9	34.2	
	2月3日	3	308.5	250.0	50.8	24.6	
	3月11日	4	137.5	205.6	—	—	
	4月27日	4	110.7	81.6	—	—	
5月25日			{ 4 24	166.6	72.7	—	—
	154.4	97.7		—	—		
戸に 外移 かし らた 室内 の	1月27日	3	119.6	258.6	—	—	戸外から室内に移して1日目
	2月3日	3	66.0	69.9	309.4	256.1	芽の表面のヤニとけ始める
	2月18日	3	45.3	50.8	515.5	277.5	枝の先端の芽開葉
	6月2日	3	266.5	1,048.0	—	—	冬芽形成後1ヵ月経過

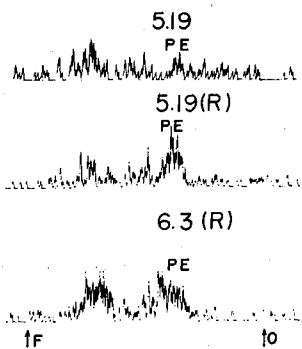
3. グリセロール-1-¹⁴C をとりこませた脂質のラジオ薄層クロマトグラフィーによる検討

ラジオ薄層クロマトグラムの放射能ピークに相当する部分をかきとり、クロロホルム・メタノール (1:1, v/v) およびメタノールで溶出し窓なしガスフローカウンターでその放射能を測定した。各脂質へのとりこみの割合を百分率で表わしたのが第4図である。各脂質へのとりこみ率は皮、材で大差なくほぼ同様の傾向を示した。中性脂質へのとりこみ率は開葉期において高く、生長停止期 (R) には低い。このことは、PC へのとりこみ率が開葉期に低く生長停止期



第4図 グリセロール-1-¹⁴Cの各脂質へのとりこみの割合

図中4.20, 5.19, 6.3はそれぞれ実験期日(第1表参照)を表わし、(R)は室内の人工条件下で生長を停止したものである。横軸の数字1, 4, 24はそれぞれ反応時間を表わす



第5図 材のPEの再クロマトグラフィー

図中の記号は第4図と同じ

(R)に高いのと対照をなしている。PEへのとりこみ率は他の脂質に比べて全般的にみて低いが、材の方が皮よりも幾分多いように思われる。しかし、クロロホルム・メタノール・酢酸(65:25:4, v/v)で展開しPEに相当する部分をかきとり、溶出して再びクロロホルム・メタノール・水(65:25:4, v/v)で展開するとPE以外の部分にも相当の放射能が分布していることがわかった(第5図)。このことから、実質的なPEへのとりこみは第4図に示した割合よりも幾分少ないことが考えられる。酸性脂質である画分IIIへのとりこみは時期的に一定の傾向を示さないが、常に全とりこみ量の5~10%の範囲内であった。

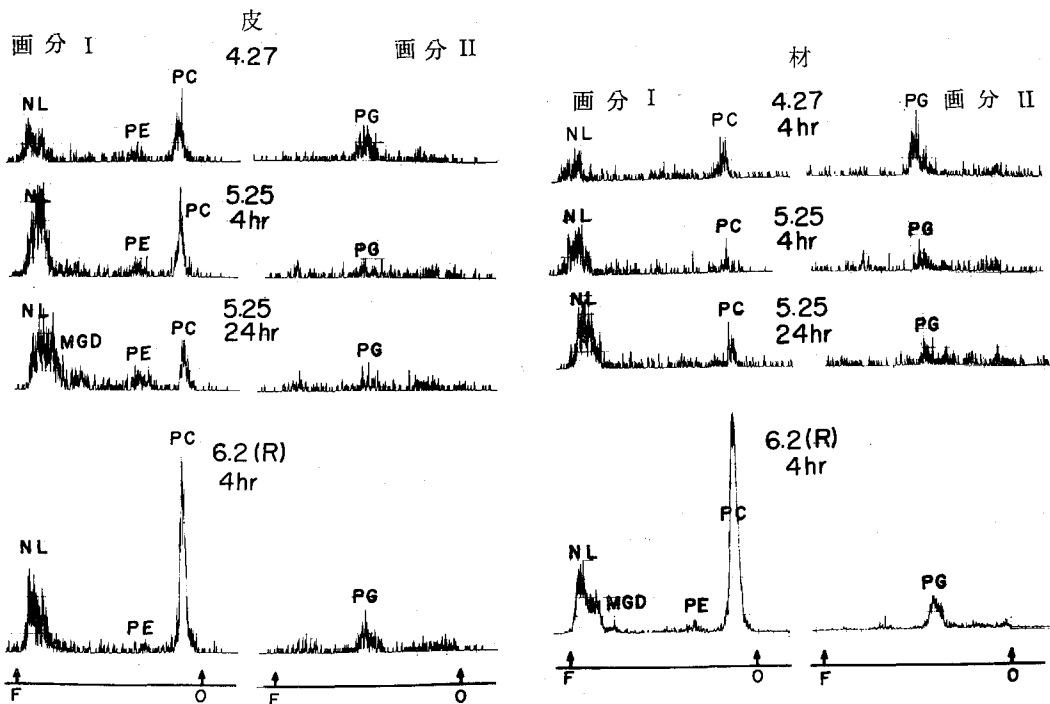
各脂質へのとりこみ率の経時的变化についてみると、PG

のそれは開葉と生長停止の両時期を通じて減少する傾向を示している。そして、開葉の初期(4月20日)ほどその変化(経時的減少)の度合は大きいように思われる。一方、PCへのとりこみ率の経時的変化は、開葉初期(4月20日)には反応時間とともに増加する傾向を示したが開葉後1カ月経過(5月19日)したものでは反応時間とともに減少した。しかし、生長停止期には経時的に殆んど変化しないか、あるいはむしろ増加(材, 6月3日)した。また、PEへのとりこみ率は各時期とも反応時間とともに増加する傾向が認められた。画分 III および中性脂質については、経時的な変化はあまり明瞭でない。

4. 醋酸-1-¹⁴C をとりこませた脂質のラジオ薄層クロマトグラフィーによる検討

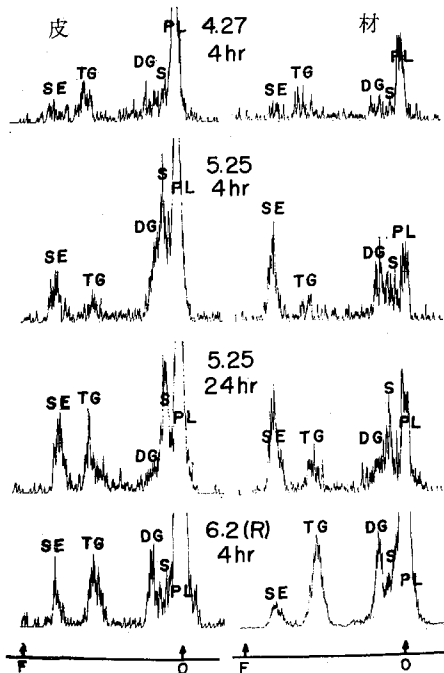
この実験では、0.5 g の DEAE セルローズカラムを用いて、枝の脂質を 30 ml のクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) で溶出し、ついで 0.1 M 醋酸アンモニウムを含むクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) で溶出しその各々を画分 I および画分 II とした。これらの両画分についてそれぞれラジオ薄層クロマトグラフィーを行なった。その結果を第 6 図に示す。

¹⁴C をとりこんだ脂質の種類は、グリセロール-1-¹⁴C の場合とほぼ一致する。しかし、個々の脂質へのとりこみの様式は、グリセロール-1-¹⁴C の場合とは少し異なっている。グリセロール-1-¹⁴C の場合では PG へのとりこみ率がいずれの時期でも常に高い水準にあるのに、この場合は開葉の進行とともに可成り低下し、冬芽形成期では他の脂質へのとりこみに比較して



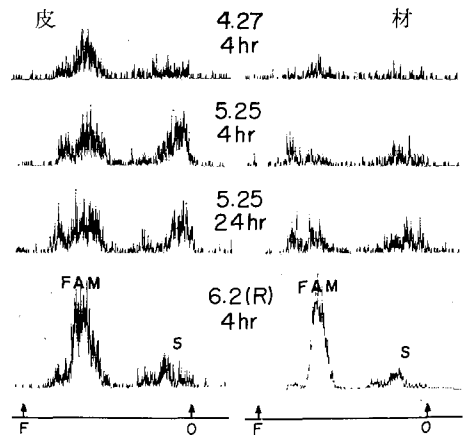
第 6 図 醋酸-1-¹⁴C をとりこませた枝の脂質のラジオ薄層クロマトグラム

4.27, 5.26 および 6.2 はそれぞれ実験期日(第 2 表参照), 4 hr および 24 hr はそれぞれ反応時間を表わす。フルスケールは材の 6.2 (R) で 10 k cpm のほかはすべて 3 k cpm。展開条件は第 2 図と同じ



第7図 酢酸-1-¹⁴Cをとりこんだ中性脂質のラジオ薄層クロマトグラム

図中の記号は第6図と同じ。展開は石油エーテル・エーテル・酢酸(80:18:1, v/v)で行なった。フルスケールは6.2(R)材で10k cpmのほかはすべて3k cpm



第8図 酢酸-1-¹⁴Cをとりこんだ脂質のアルカリ・メタノリシス後のエーテル可溶画分のラジオ薄層クロマトグラム

方法は本文を参照。展開は石油エーテル・エーテル・酢酸(82:18:1, v/v)で行なった。FAMは脂肪酸メチルエステル, Sはステロールを表わす。そのほかの記号は第6, 第7図と同じ。フルスケールは6月2日の材で3k cpmのほかはすべて1k cpm

以上のような傾向は皮, 材ともほぼ同様に認められる。PEへのとりこみ率はグリセロール-1-¹⁴Cの場合と同様に極めて低い。

中性脂質をラジオ薄層クロマトグラフィーでしらべると第7図のような結果が得られた。開葉後, 生長が活発となるにつれて, ステロールおよびステロールエステルへのとりこみが増加する。材においては, 開葉後1カ月を経過した5月25日頃, ステロールエステルへの著しいとりこみがみられ, これは遊離ステロールへのとりこみを上まわっている。しかし, 開葉の初期と冬芽形成期にはステロールエステルへのとりこみは少ない。

第3表 酢酸ナトリウム-1-¹⁴Cをとりこんだ枝の脂質中の放射能分布

実験期日	反応時間 (時間)	皮		材	
		エーテル層 (%)	水層 (%)	エーテル層 (%)	水層 (%)
4月27日	4	97.3	2.7	91.2	8.0
5月25日	4	97.1	2.9	100.0	0
	24	98.5	1.5	100.0	0
冬芽形成 (6月2日)	4	98.7	1.3	99.2	0.8

極めて少ない。また, 冬芽形成期にはPCへのとりこみ率が極めて多い。NLへのとりこみ率は開葉の進行につれて相対的に増大し, 全脂質のおよそ6割以上を占めるが, 冬芽形成後は減少する。

DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーにおける画分 I について、メタノール性苛性カリでメタノリシスして得られるエーテル可溶性と水層への ^{14}C の分布をしらべた。第3表に示すように、いずれの実験期日においても大部分の放射能はエーテル可溶性の部分に回収される。このエーテル可溶性の画分をラジオ薄層クロマトグラフィーでしらべた。第8図に示すように、開葉の初期(4月27日)および冬芽形成期では皮、材ともに脂肪酸メチルエステルに大部分の放射能が検出される。開葉後、芽の伸長が活発な5月25日頃はステロールへのとりこみが増し、これは全とりこみ量のおよそ40~50%に相当し、他の時期とは違ったとりこみの様式が認められる。このことは、ポプラにおけるステロールの合成が生長期において非常に活発であり、この時期にはアセチル CoA から脂肪酸合成系への代謝が、ステロール合成系へと転換されることを示唆しているものと思われる。

IV. 考 察

通常の方法では、ポプラの枝の脂質画分に着色性(黄褐色)の溶媒可溶性成分が多量に混入していて、各脂質の分画上大きな問題があった。薄層クロマトグラフィーにおいてはこのことがテーリングの原因となって脂質相互の分離を不充分ならしめた。

この実験では、DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで前処理して着色性成分の大半を吸着させて取除き、かつ脂質を大まかに分画し、その各画分についてラジオ薄層クロマトグラフィーを行なうことによって脂質相互の分離と同定が可成り容易となった。

開葉期の脂質代謝の特徴として、全体としてみたとき(1)グリセロールのとりこみが増大する反面、醋酸のとりこみが低下すること、(2)グリセロールおよび醋酸の中性脂質へのとりこみが大きいこと、(3)全リン脂質の量はこの時期に著しく減少する¹⁾ことの3点があげられる。このような特徴から考えて、この時期には古い組織における生体膜の分解により生ずるグリセロールと脂肪酸が、あたらしく形成される組織へと移動し、そこであたらしい生体膜の合成のために消費される可能性が強いように思われる。

冬芽形成期には、グリセロールおよび醋酸の脂質へのとりこみがともに増大し、PCへのとりこみが著しく大きい。このことは、細胞内において開葉期とは異なった生体膜の代謝が開始されることを示唆するものと思われる。

一方、両時期を通じてPEへのとりこみは極めて少ない。このことはグリセロール- $1-^{14}\text{C}$ でも醋酸- $1-^{14}\text{C}$ でも共通してみられることである。まえの報告¹⁾で、開葉の前後でポプラの皮のリン脂質を硅胶カラムで分析したとき、開葉前には多量のPEが含まれ開葉後著しく減少することをのべた。しかし、あとで判明したのであるが、硅胶カラムにおいてPEとPGとの分離はその時の条件(溶媒の精製度、硅胶の活性度および脂質の抽出精製法など)により影響されるので再検討を必要とする。

醋酸- $1-^{14}\text{C}$ のアミノ酸画分へのとりこみは、脂質へのとりこみとは逆の方向に変動する。すなわち、開葉とともに脂質へのとりこみが減少するのにアミノ酸画分へのとりこみは開葉前の約10倍に増加する。このことは、開葉とともにTCA回路が活発となり、アセチル CoA の多くの部分がATPの産生あるいはアミノ酸の合成のために消費されることが予想される。

アセチル CoA から脂肪酸およびステロールへの代謝の転換は、開葉期から生長期、および生長期から冬芽形成期にかけて起こることが推察される。事実、生長期には醋酸からステロールへのとりこみが非常に活発である。このことは、今後ポプラの脂質代謝ならびに脂質の組成変化を追究する上でひとつの糸口を与えるものと考えられる。

これまでの実験は、いろいろな生育段階のポプラの枝について比較的高温 (20°C) での反応をしらべたものである。今後、いろいろの反応温度、ことに低温下における脂質の代謝についてしらべていく予定である。

V. 摘 要

開葉期と生長停止期のポプラの脂質代謝を明らかにするため、グリセロール-1-¹⁴C と醋酸-1-¹⁴C の脂質へのとりこみを検討した。

グリセロール-1-¹⁴C の脂質へのとりこみは、開葉期において急激に増加した。これと対照的に、醋酸-1-¹⁴C の脂質へのとりこみは冬から早春にかけてかなり高い水準に保たれ、開葉とともに低下することが明らかとなった。一方、生長停止期ではグリセロール-1-¹⁴C および醋酸-1-¹⁴C のとりこみは両者とも極めて活発であった。

グリセロール-1-¹⁴C と醋酸-1-¹⁴C は、主として NL (TG, DG), PC, PG, PE および未同定の酸性リン脂質にとりこまれた。グリセロール-1-¹⁴C および醋酸-1-¹⁴C から各脂質へのとりこみ様式は各時期においてある程度の差が認められた。

醋酸-1-¹⁴C からステロールへのとりこみは、開葉の初期や生長停止期は不活発であるが、開葉後 1 カ月を経過したものでは非常に活発であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 吉田静夫 1970 開葉期のポプラのグリセリン代謝. 低温科学, 生物篇, **28**, 63-71.
- 2) 吉田静夫 1971 秋のポプラにおけるグリセロール代謝. 低温科学, 生物篇, **29**, 47-52.
- 3) Allen, C. F., Good, P., Davis, H. F., Chisum, P. and Fowler, S. D. 1966 Methodology for the separation of plant lipids and application to spinach leaf and chloroplast lamellae. *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **43**, 223-231.
- 4) Ferrari, R. A. and Benson, A. A. 1961 The path of carbon in photosynthesis of the lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 185-192.

Summary

As a prelude to the study of the metabolism of lipids in poplar twigs, several experiments were carried out on the incorporation of glycerol-1-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C into lipids *in vivo* at different developmental stages.

The incorporation of glycerol-1-¹⁴C into lipids appeared to increase appreciably in parallel with bud opening, in contrast, the incorporation of acetate-1-¹⁴C was revealed to decrease as the bud opening proceeded, while it remained rather active in winter. On the other hand, both glycerol-1-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C were actively incorporated into lipids by the twigs in the growth cessation stage.

By means of radio thin layer chromatography on silica gel H, the majority of

radioactivity from glycerol-1-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C was found in triglyceride, diglyceride, phosphatidyl choline, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl ethanolamine and unidentified acidic lipid (s) in all of the developmental stages of the twigs. The patterns of the incorporation of glycerol-1-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C into each lipid were found to vary to some extent depending on the developmental stages.

The incorporation of acetate-1-¹⁴C into sterol compounds appeared to be highly active after one month from bud opening, whereas it seemed to be inactive as the growth ceased.